اختلالات کروماتین اسپرم بر تشکیل پرونوکلئوس با اندازه نامساوی در IVF و ICSI

محمد حسین نصر اصفهانی (Ph.D.)[۱،۲،۳]، شهناز رضوی (Ph.D.)[۳]، محمد مردانی (Ph.D.)[۳]، افسانه مافی (M.S.)[۴]، عباس مقدم (M.Sc.)[۴]، صفورا توفیق حسابی(M.Sc.)[۴].

۱- استادیار، گروه جنین‌شناسی و آندرولوژی، پژوهشکدهٔ رویان، جهاددانشگاهی واحد علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲- مسئول گروه جنین‌شناسی، مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران.

۳- استادیار، گروه جنین شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان. ایران.

۴-مربی، گروه جنین‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

براساس تحقیقات مختلف اندازه، مرفولوژی و وضعیت قرارگیری پرونوکلئوس‌ها می‌تواند بر کیفیت رویان، لانه‌گزینی و حاملگی تأثیر داشته باشد. در این تحقیق رابطه احتمالی بین تستهای بلوغ کروماتین اسپرم (CMA3، آنیلین بلو، SDS، SDS+EDTA) و شاخصهای اسپرم با درصد جنینهای دارای پرونوکلئوس نامساوی ارزیابی شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده از ۱۱۵ بیماری که برای ICSI و IVF مراجعه نمودند، برای ارزیابی غلظت، تحرک، مرفولوژی اسپرم همچنین تستهای بلوغ هسته اسپرم قبل و بعد از آماده‌سازی، استفاده شد. ۱۷ تا ۱۹ ساعت پس از مجاورت اسپرم با تخمک در IVF یا ICSI، با توجه به حضور و اندازه پرونوکلئوس‌ها، زیگوتها امتیازدهی شدند و رابطه بین درصد زیگوتهای با پرونوکلئوس نامساوی با شاخصهای اسپرمی و تستهای بلوغ هسته اسپرم تعیین گردید. بین درصد زیگوتهای با پرونوکلئوس نامساوی و کمبود پروتامین (به روش CMA3) و هیستون اضافی (با رنگ‌آمیزی آنیلین بلو) و توانایی کروماتین اسپرم برای خروج از تراکم (SDS+EDTA) یک رابطه مثبت معنی‌دار در بیماران ICSI بدست آمد؛ اما در بیماران IVF بین هیچ یک از شاخصهای اسپرمی و تست‌های مذکور با درصد زیگوت‌های با پرونوکلئوس نامساوی رابطه‌ای مشاهده نشد، در صورتیکه بیماران را به دو گروه CMA3 مثبت کمتر از ۳۰٪ و بیش از ۳۰٪ تقسیم کنیم در هر دو روش ICSI و IVF یک اختلاف معنی‌داری بین درصد زیگوتهای با پرونوکلئوس نامساوی و میزان لقاح در دو گروه بدست آمد. ارزیابی وضعیت کروماتین بسیار مهم است چون کمبود پروتامین نه تنها اثر مستقیم بر میزان لقاح و کیفیت پرونوکلئوس دارد بلکه براساس نتایج این مطالعه بر روی تکامل رویان در هر دو روش ICSI و IVF تأثیر می‌گذارد. تأثیر وضعیت کروماتین غیرطبیعی ممکن است به واسطه تشکیل غیرطبیعی پرونوکلئوس باشد؛ زیرا احتمال دارد در روش ICSI اسپرم با کروماتین غیرطبیعی به داخل اووسیت تزریق شود.

گل واژگان: پرونوکلئوس با اندازه نامساوی، کروماتین اسپرم، تزریق داخل تخمکی اسپرم، لقاح آزمایشگاهی، و کمبود پروتامین.

آدرس مکاتبه: دکتر محمدحسین نصراصفهانی، گروه جنین‌شناسی و آندرولوژی، پژوهشکدهٔ رویان، پلاک ۳۶، کوچه سیمین، تقاطع آصف، خیابان زعفرانیه، صندوق‌پستی ٤٦٤٤-١٩٣٩٥، تهران، ایران.

پست الکترونیک: Nasrmhn@yahoo.com

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

لقاح یک فرایند چند فاکتوری است که در طی آن اسپرم به داخل تخمک نفوذ می‌کند و ژنوم پدری را به داخل اووسیت منتقل می‌نماید. اما یکی از ویژگی‌های لقاح، جلوگیری از داخل‌شدن اسپرم غیرطبیعی به داخل اووسیت می‌باشد. در طی لقاح طبیعی در بدن، احتمال رسیدن اسپرم غیرطبیعی به محل لقاح به حداقل ممکن می‌رسد؛ در حالیکه در IVF[1] همراه اسپرم طبیعی، اسپرمهای غیرطبیعی نیز با اووسیت مجاور می‌شوند و در نتیجه چنین اسپرمهایی ممکن است توانایی بارورکردن اووسیت را پیدا نمایند؛ اما روش ICSI[2] برخلاف IVF، به عنوان یک روش مؤثر در درمان ناباروری مردان با اسپرمهای غیرطبیعی در نظر گرفته می‌شود و با این وجود درصد بالایی از باروری وحاملگی قابل قبول در روش ICSI گزارش شده است(۲،۱) آنومالیهای متعددی در اسپرم گزارش شده که از جمله مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم و آنالومی کروماتین را می‌توان نام برد. ارتباط بین آنومالیهای ذکر شده با میزان لقاح بطور وسیع در IVF و تا حدی در ICSI مطالعه شده است (٤،٣). از میان شاخصهای اسپرمی و تست‌های عملکرد اسپرم، مرفولوژی اسپرم و آنومالیهای کروماتین بالاترین ارتباط مستقل را با میزان باروری نشان می‌دهند(٥). تحقیقات دیگر حاکی از آن است که در روش ICSI میزان لقاح اسپرم با مرفولوژی و کروماتین غیرطبیعی، کمتراست(٦).

مرفولوژی و موقعیت قرارگرفتن پیش‌هسته‌ها در زیگوت نیز برروی روند تکامل بعد از لقاح، شامل تشکیل بلاستوسیست و میزان حاملگی تأثیر دارد. سیستم‌های امتیازدهی[3] و راهنماهای مختلفی برای انتخاب جنینی با بیشترین توانایی برای تشکیل بلاستوسیست و لانه‌گزینی وجود دارد(۷-۱۰).

هدف این سیستم‌های امتیازدهی، کاهش تعداد انتقال رویان به رحم و به دنبال آن کاهش میزان حاملگی چندقلویی می‌باشد. اساس امتیازدهی این سیستم‌ها ترکیبی از اندازه پیش‌هسته‌ها، تعداد هستک‌ها و توزیع آنها می‌باشد. هر چند در میان این دسته‌بندی‌ها اندازه پیش‌هسته‌ها کمترین امتیاز را دارد. این بدین معنا است که رویان‌های دارای پیش‌هسته‌های نامساوی کمترین توانایی را برای تشکیل بلاستوسیست و به دنبال آن لانه‌گزینی و در نتیجه حاملگی دارند(۷-۹).

مطالعات محققین بیانگر این است که غیر مساوی بودن پیش‌هسته‌ها می‌تواند مربوط به تغییرات بعد از بلوغ اووسیت‌های مسن باشد، که نتیجه آن یک پیش‌هسته مادهٔ بزرگ و واضح و سر اسپرم متراکم یا با تورم جزئی است(۱۱).

اسپرمهای دچار آنومالیهای کروماتین مانند هیستون اضافی یا کمبود پروتامین هنگامی که وارد اووسیت بالغ می‌شوند مستعد تراکم زودرس کروماتین (PCC)[4] می‌گردند که علت آن عملکرد فاکتور پیشبرنده تقسیم MPF[5] فعال بر روی ساختار هیستونی غیرطبیعی موجود در اسپرم می‌باشد(۱۳،۱۲) و مدت زمانیکه هسته اسپرم برای خروج از تراکم زودرس کروماتین به طور نسبی (PPCC)[6] و تبدیل شدن به پیش‌هسته نیاز دارد موجب نامساوی‌شدن اندازه پیش‌هسته‌ها می‌شود. لذا رویانی که از سلولهای تخم دارای پیش‌هسته‌های نامساوی تشکیل شده باشد، استعداد کمتری برای تشکیل بلاستوسیست، لانه‌گزینی و در نتیجه حاملگی دارد(۷، ۹).

در نتیجه مطالعهٔ شاخصهای مؤثر در نامساوی بودن پیش‌هسته، ضروری بنظر می‌رسد. هدف این مطالعه بررسی تأثیر آنومالیهای کروماتین اسپرم مانند اختلالات کمبود پروتامین، هیستون اضافی، ناپایداری

1-In Vitro Fertilization
2-Intracytoplasmic Sperm Injection
3-Scoring
4-Premature Chromatin Condensation
5-Meiosis Promoting Factor
6-Partial PCC

Downloaded from http://www.jri.ir

کروماتین، توانایی اسپرم برای خروج از تراکم به ترتیب بـه روشـهای رنـگ‌آمیـزی CMA3[1]، AB[2]، SDS[3]، SDS+EDTA و مرفولـوژی اسـپرم بـر تفـاوت انـدازه پیش‌هسته‌ها بعد از IVF و ICSI است.

مواد و روشها

- **آمـاده‌سـازی اسـپرم**: نمونـه‌هـا از ۱۱۵ زوج نابـارور مراجعه‌کننده بـه مرکـز بـاروری و نابـاروری اصـفهان بدست آمد. ۵۵ نفر از این تعداد کاندید عمـل ICSI و ٦۰ نفر کاندید عمل IVF بودند. نمونه‌های منی[4] بعـد از ٤-۳ روز پرهیز از نزدیکـی، جمـع‌آوری و جهـت اسـتفادهٔ از اسپرم برای IVF و ICSI قسمت عمـده نمونـه بـا پرکـل (Seromed-Germany) (۵۰-۷۰-۹۰) آماده‌سازی شـد و بعد از تلقیح اووسیت و اسـپرم، بخـش باقیمانـده نمونـه اسپرم بـرای آنـالیز و بررسـی آنومالیهـای مرفولـوژی اسپرم و بررسی کروماتین بـه روش آنیلـین‌بلـو(AB) و CMA3، SDS، SDS+EDTA مورد استفاده قرار گرفـت و ۲۰۰ اسپرم برای هر شاخص شمارش شد.

- **ارزیابی هیستون اضافی در روش رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو**: با قراردادن یک قطـره از مـایع سـیمن بـه روی یـک لام تمیز و کشیدن این قطره توسط لام دیگری که بـا زاویـهٔ ٤۵[0] روی آن قـرار دارد از نمونـه اسـمیر تهیـه شـد. اسـمیرها بـرای مـدت ۳۰ دقیقـه در گلوتـار آلدئیـد (Sigma-USA) ۳٪ در بـافر فسـفات ۰/۲ مـولار: ($14ml\ NaH_2PO_4 0.2\ M + 36ml\ Na_2HPO_4\ 0.2\ M$ pH=7.2) ثابت[5] و سپس اسمیرها با رنگ آنیلین‌بلو ۵٪ در اسـید اسـتیک ٤٪، با pH = ۳/۵ به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند(۱٤).

- **ارزیـابی کمبـود پروتـامین توسـط رنـگ‌آمیـزی کروموماسین A3**: نمونه‌ها در محلول کارنوی[6] (متـانول با اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳:۱) در درجه حرارت 4^0C برای مدت ۵ دقیقه ثابت شدند. سپس از نمونه‌هـای ثابـت شـده اسـمیر تهیـه شـد. بـرای رنـگ‌آمیـزی کروموماسین، هر اسلاید به مدت ۲۰ دقیقـه در $100ml$ از محلـول CMA3 بـا غلظـت $0/25\ mg/ml$ کـه در بـافر مک‌الوین حل شده بود (7^{ml} اسید سیتریک ۰/۱ مـولار+ $32/9^{ml}$ pH=۷ $Na_2HPO_47H_2o$ حـاوی کلریـد منیـزیم ۱۰mM) قرار گرفت. سپس اسلایدها بـا بـافر شستشـو داده شـد و بـا بـافر گلسـیرول بـه نسـبت (۱:۱) مونـت[7] گردید. آنالیز میکروسکوپی بـا میکروسـکوپ فلورسـنت (Japan-Nikon-Eclipse600) بـا فیلتـر مناسـب nm ٦۰۰-٤۷۰ صورت گرفت. با تعیین درصد اسپرمهای با رنگ زرد درخشـان (CMA3 مثبت) و اسـپرمهای بـا رنگ زرد کمرنگ (CMA3 منفی) ارزیابی میـزان کمبـود پروتامین انجام شد(۵).

- **تست پایداری کروماتین اسـپرم SDS و میـزان خـروج از تراکم SDS+EDTA**: $50ml$ از اسپرمی که بـا روش پرکـل آمـاده شـده بـود، بـا $350ml$ محلـول ۱٪ SDS در بـافر بـورات $0/05M$ (pH=۹) $400ml \simeq$ تترابـورات سـدیم $0/1M$ NaOH $88ml$ +٤/۲ml) مخلـوط و بعـد از انکوباسیون[8] به مدت ٦۰ دقیقه در دمـای $37C^0$، واکـنش بوسیله حجم معادل از گلوتارآلدئید ۲/۵٪ در بورات بافر $0/5M$ متوقـف شـد و وضـعیت تـورم هسـته بعـد از رنگ‌آمیزی با گیمسا[9] مورد بررسی قرار گرفت. سـپس درصد ناپایداری یا تراکم اسپرم تعیین شد.

جهت انجـام روش SDS+EDTA، بـه محلـول ۱SDS٪، $6mM$ EDTA اضافه شد و بقیـه مراحـل مطـابق روش SDS انجام گرفت(۱۵).

بررسی اسپرم: برای شـمارش اسـپرمها از شـمارش‌گـر Makler Chamber اسـتفاده و بعـد از بـی‌حرکـت‌کـردن اسپرمها با یک محلول ثابت‌کننده تعداد بصورت میلیـون

1-Chromomycin A3
2-Aniline Blue
3-Sodium Dodooyl Sulfate
4-Semen
5-Fix
6-Carnoy
7-Mount
8-Incubation
9-Gimsa

Downloaded from http://www.jri.ir

در میلی‌لیتر بیان شد. درصد حرکت با بررسی مستقیم میکروسکوپی ارزیابی و مرفولوژی بوسیله رنگ‌آمیزی پاپانیکولا مطابق با تکنیک Strict Criteria بررسی گردید(۱۶).

روش IVF: تخمکها تحت هدایت سونوگرافی جمع‌آوری و سپس در محیط IVF-20 در زیر روغن[1] کشت و پس از آن در محیط IVF-20 تلقیح شدند. وقوع لقاح بوسیله میکروسکوپ معکوس[2]، ۱۹-۱۷ ساعت بعد از تلقیح بررسی شد.

روش ICSI: بعد از جمع‌آوری تخمک‌ها، در محیط IVF-20 حاوی هیالورونیداز ۸۰*IU/ml* (Sigma-USA) به مدت کمتر از یک دقیقه انکوبه شدند. سپس تخمکها شستشو داده شد تا هیالورونیداز از محیط حذف و سلولهای اطراف اووسیت نیز جدا شود. سرانجام تخمک‌های برهنه شده به محیط کشت HAM'S+HEPES زیر روغن در ظرف کشت فالکون مخصوص میکرواینجکشن انتقال داده شدند. اسپرمهای آماده شده در قطرات PVP قرار گرفتند. در زیر میکروسکوپ معکوس بهترین اسپرم از لحاظ مرفولوژی از میان اسپرمها انتخاب و بوسیله سوزن میکرواینجکشن به داخل تخمک تزریق شد. تخمک‌های تزریق شده درمحیط G1.2 انکوبه و تخمک‌های مسن و نارس از این مطالعه حذف شدند.

بررسی اندازه پیش‌هسته‌ها: در طی بررسی لقاح، وجود و تعداد پیش‌هسته‌ها زیر میکروسکوپ معکوس ثبت و برای بررسی اندازه پیش هستهٔ غیرمساوی از صفحهٔ نمایش متصل به میکروسکوپ استفاده شد. دو پیش‌هسته که اختلاف بین آن دو بیش از ۱۵٪ مطابق فرمول زیر باشد غیرمساوی در نظر گرفته شدند.

تفاوت بین قطر دو پیش‌هسته به قطر بزرگترین پیش‌هسته ضربدر ۱۰۰. درصورتیکه اختلاف دو پیش‌هسته کمتر از ۱۵٪ باشد بعنوان مساوی در نظر گرفته شد.

استانداردکردن نتایج: استانداردکردن طبق روش ارائه شده در مقالهٔ قبلی مؤلف انجام شد(۵). بدین ترتیب که ارزیابی ۱۰۰ سلول در ۱۰ میدان دید متفاوت میکروسکوپی (جمعاً ۱۰۰۰ سلول) از همان نمونه منی جهت تعیین ضریب خطای بیرونی[3] و جهت تعیین ضریب خطای درونی[4] انجام تست‌های ارزیابی بلوغ هسته اسپرم و شمارش ۲۰۰ سلول در ۵ نمونه مختلف از همان بیمار استفاده شد. برای محاسبه ضریب واریانس از فرمول انحراف معیار تقسیم بر میانگین ضربدر ۱۰۰ استفاده و ضریب واریانس در نتایج کمتر از ۱۱٪ برای تمامی تستهای بلوغ هسته تعیین شد.

- **آنالیز آماری**: آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS-10 انجام گرفت. با استفاده از این نرم‌افزار ضریب همبستگی تمامی شاخصها بررسی و همچنین با استفاده از آزمون t-test اختلاف میانگین درصد لقاح، درصد زیگوت‌های با پرونوکلئوس نامساوی و امتیاز کیفیت جنین در دو گروه CMA3 مثبت کمتر از ۳۰٪ و بیشتر از ۳۰٪ تعیین شد.

نتایج

جدول شماره ۱ ارتباط بین درصد اووسیت‌های با پیش هسته‌های نامساوی یا آنومالیهای کروماتیس اسپرم را نشان می‌دهد در مورد روش ICSI یک ارتباط معنی‌دار بین درصد پیش هسته‌های نامساوی با کمبود پروتامین و هیستون اضافی موجود در اسپرم شستشو داده شده مشاهده شد؛ همچنین یک ارتباط منفی بین درصد اووسیت‌های با پیش هسته‌های نامساوی و توانایی خروج از تراکم اسپرم که بوسیله SDS+EDTA اندازه‌گیری شده بود بدست آمد. بین هیچ یک از

1-Sigma- mineral oil
2-Invert
3-Intra assay variation
4-Inter assay variation

Downloaded from http://www.jri.ir

دولل ۱- رابطه بین درصد زیگوتهای با اندازه پرونوکلئوس نامساوی با تستهای بلوغ هسته اسپرم و شاخصهای اسپرمی در روش ICSI و IVF

متغیر	روش	ICSI		IVF	
		r	P.value	r	P.value
تستهای بلوغ هسته اسپرم و شاخصهای اسپرمی	CMA3 مثبت(BP)	۰/۲۶	NS	۰/۲۴	NS
	CMA3 مثبت(AP)	۰/۵۱	۰/۰۰۱	۰/۳۳	NS
	رنگ‌پذیری با آنیلین بلو (BP)	۰/۱۷	NS	-۰/۲۶	NS
	رنگ‌پذیری با آنیلین بلو (AP)	۰/۲۸	۰/۰۳۹	۰/۱۶	NS
	(BP) SDS	۰/۰۲	NS	-۰/۱۰	NS
	(AP) SDS	۰/۱۸	NS	- ۰/۰۱	NS
	(BP) SDS+EDTA	-۰/۱۱	NS	۰/۵۲	NS
	(AP) SDS+EDTA	-۰/۲۸	۰/۰۴۱	۰/۰۷	NS
	ایندکس مورفولوژی (BP)	-۰/۲۰	NS	-۰/۲۲	NS
	ایندکس مورفولوژی (AP)	-۰/۲۳	NS	-۰/۳۰	NS
	تحرک اسپرم	-۰/۱۴	NS	– ۰/۰۴	NS
	تعداد اسپرم (Million/ml)	-۰/۱۱	NS	-۰/۰۴	NS

NS: Not significant
BP: قبل از آماده‌سازی اسپرم
AP: بعد از آماده‌سازی اسپرم

پارامترهای فوق‌الذکر با درصد زیگوت‌های با پرونوکلئوس نامساوی قبل از شستشو در نمونه سیمن رابطه‌ای دیده نشد. همچنین با پارامترهای اسپرمی نیز ارتباطی در روشهای IVF و ICSI مشاهده نشد. اگرچه در این بررسی مطالعه پایداری کروماتین (تست SDS) ارتباط مهمی مشاهده نشد. این نتایج بیانگر آن است که هر چه درصد اسپرمهای با کمبود پروتامین با اسپرمهای دارای هیستون اضافی و همچنین قدرت خروج از تراکم اسپرم کمتر باشد، شانس تشکیل زیگوت با پرونوکلئوس نامساوی افزایش می‌یابد(جدول شماره ۱). با توجه به اینکه عده‌ای از محققین CMA3 مثبت کمتر از ۳۰٪ واحد طبیعی در نمونه سیمن می‌دانند؛ لذا در جدول شماره ۲ بیماران به دو گروه براساس درصد CMA3 مثبت آنها گروه‌بندی شدند و نتایج بیانگر است که در بیماران IVF و ICSI میانگین اختلاف درصد زیگوت‌ها با پرونوکلئوس نامساوی و میزان لقاح در دو گروه کمتر و بیشتر از ۳۰٪ متفاوت می‌باشند.

بحث

لقاح پدیده‌ای است که در طی آن گامت نر و ماده با الگوی متفاوت کروماتین به پیش‌هسته‌ها تبدیل می‌شوند. اگرچه پذیرفته شده است که پدیده‌های مرتبط با لقاح باید ترجیحاً بصورت هماهنگ عمل کرده تا تکامل بطور طبیعی ادامه پیدا نماید؛ ولیکن هیچگونه اطلاعاتی در مورد تأثیر پیش‌هسته‌های غیرمساوی بر روی تکامل جنین وجود ندارد. هدف این مطالعه ارزیابی آنومالیهایی است که ممکن است در روند طبیعی تشکیل پیش‌هسته‌ها تأثیر داشته باشد. گزارشهای اخیر بیانگر این است که

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول۲- مقایسه میانگین و انحراف معیار اختلاف درصد زیگوتهای با پرونوکلئوس نامساوی، درصد لقاح، مجموع امتیاز کیفیت جنین درIVF و ICSI

روش / متغیر	ICSI			IVF		
	CMA3<30	CMA3>30	P-Value	CMA3<30	CMA3>30	P-Value
زیگوتهای با پرونوکلئوس نامساوی(٪)	۲۲/۸±۲۱/۹	۵۰/۷±۳۹/۶	۰/۰۰۱	۲۶/۱±۲۵/۲	۴۲/۵±۴۱/۳	۰/۰۲۶
لقاح (٪)	۷۸/۹±۱۶/۶	۶۶±۲۵/۱	۰/۰۳۳	۷۴/۵±۳۰/۹	۵۶/۳±۳۲/۶	۰/۰۳۶

NS: Not significant

آنومالیهای مرفولوژیک پیش‌هسته‌ها شامل اندازه، موقعیت قرارگیری و توزیع محتویات آنها، بر رشد تخم، لانه‌گزینی و حاملگی تأثیر می‌گذارد(۱۰-۷). از میان مشخصات مرفولوژیک پیش‌هسته‌ها، نامساوی بودن پیش‌هسته تأثیر بیشتری بر تکامل جنین دارد. فاکتورهایی که روی اندازه پیش‌هسته تأثیر دارد چندان مشخص نشده‌اند، فقط یک گزارش در مورد اندازه نامساوی پیش‌هسته در انسان وجود دارد که حاکی از آن است که اندازه نامساوی پیش‌هسته‌ها مربوط به تغییرات بعد از بلوغ در اووسیت می‌باشد.

در این مطالعه Goud و همکارانش در سال ۱۹۹۹ به بررسی وضعیت پیش‌هسته اووسیت‌های خواهری در ICSI بلافاصله بعد از بلوغ یا ٦ ساعت پس از بلوغ پرداختند و نتیجه گرفتند که درصد پیش‌هسته‌های نامساوی هنگامی که ICSI با تأخیر انجام می‌گیرد (٦ ساعت) افزایش می‌یابد. آنها پیشنهاد کردند که این پدیده می‌تواند مربوط به فاکتورهای زیر باشد؛ عدم خروج از تراکم کروماتین بطور کامل می‌تواند ناشی از کاهش فعالیت فاکتورهای لازم جهت خروج از تراکم مانند کاهش سطح گلوتاتیون باشد(۱۷، ۱۸).

افزایش حساسیت اووسیت‌های مسن به تحریکات فعال‌کننده منجر به فعال‌شدن خودبه‌خودی مانند بکرزائی می‌گردد. این تحریکات می‌تواند ناشی از فرآیند تزریق باشد که در نهایت منجر به پیش‌هسته ماده کاملاً مشخص و یک هسته اسپرم متراکم و یا نسبتاً نامتراکم می‌گردد(۱۹).

مطالعه دیگری که توسط Fulka و همکارانش انجام شد، نشان داد که نتیجه تزریق اسپرم با تأخیر بیش از ۲ ساعت به داخل تخمک‌های فعال‌شده موش، تشکیل غیرطبیعی پیش‌هسته‌ها و همچنین تکامل و لانه‌گزینی غیرطبیعی جنین می‌باشد. این محققین چنین نتیجه گرفته‌اند که فاکتورهای سیتوپلاسمی که امکان تبدیل هسته اسپرم را به پیش‌هسته پدری می‌دهد در طی ۲-۱/۵ ساعت پس از لقاح یا با فعال‌شدن تخمک کاهش می‌یابد و بنابراین ژن پدری که در اولین سیکل سلولی تخم شرکت نکند و یا با سیکل سلولی همگام نشود، نمی‌تواند بعنوان یک بخش فعال در ژنوم جنینی شرکت کند(۲۰).

هماهنگی تشکیل پیش‌هسته‌ها و سیکل سلولی بین گامت مرد و زن به شدت به ساختمان کروماتین اسپرم وابسته است(۱۳). در طی مراحل ساخت اسپرم[1]، پروتامین جایگزین هیستون می‌شود و پل‌های دی‌سولفیدی مطلوب در طی مراحل ساخت اسپرم و عبور از اپی‌دیدیم تشکیل می‌شوند. این ساختار بعداً با تشکیل پیوندهای غیرکوالانسی بین گروههای سولفیدریل و Zn^{2+} بعد از انزال پایدارتر می‌گردند(۲۱). پس از لقاح و برداشت Zn^{2+}، باندهای دی سولفیدی با

1-Spermiogenesis

Downloaded from http://www.jri.ir

فعالیت گلوتاتیون اووسیت کاهش پیدا می‌کند. به دنبال این پدیده پروتامینها با هیستون‌ها جایگزین می‌شوند(۲۲) و بعد از اینکه پروتامین در ساختمان اسپرم سازماندهی شد، MPF فعال نمی‌تواند روی این نوع کروماتین عمل کند؛ بنابراین اسپرم از PCC محافظت می‌شود(۱۳). بدنبال غیرفعال شدن MPF در پی فعال شدن اووسیت و جایگزینی هیستون بجای پروتامین پیش‌هسته نر تشکیل می‌شود که نتیجهٔ آن هماهنگی سیکل سلولی است.

اسپرمهایی که آنومالی کروماتین منجمله کمبود پروتامین یا هیستون اضافی دارند احتمالاً در طی لقاح مستعد PCC هستند. نوع PCC مشاهده شده با انواع آنومالیهای اسپرم ممکن است با نوع PCC در اثر کمبود کامل پروتامین فرق داشته باشد. چنین موقعیتی در تزریق اسپرماتید نابالغ به داخل اووسیت هم دیده می‌شود که در واقع این یکی از دلایل اصلی کم‌بودن میزان موفقیت تزریق اسپرماتیدهای گرد (ROSI) است(۱۳). بنابراین وقتی اسپرمی با کمبود نسبی پروتامین یا هیستون اضافی، وارد اووسیت در مرحله متافاز II می‌شود ممکن است پدیده PPCC به وقوع پیوندد. در نتیجه ممکن است مدت زمانی که جهت خروج از PPCC طول می‌کشد باعث اندازه غیریکسان پیش‌هسته‌ها شود. امکان دارد این فرضیه تفسیری برای ارتباط مثبت مشاهده شده بین کمبود پروتامین (CMA3 مثبت)، هیستون اضافی (آنیلین بلو) و درصد زیگوت‌ها با اندازه پیش‌هسته نامساوی باشد(جدول۱).

از آنجا که این رابطه تنها با نمونه‌ها پس از شستشو مشاهده شد این تفاوت را چنین می‌توان تفسیر کرد که اختلاف، ناشی از این حقیقت است که تعداد زیادی از اسپرمهایی که کروماتین غیرطبیعی دارند در طی روشهای آماده‌سازی حذف می‌شوند(۲۳،۲٤) و نمونه‌هایی که از ابتدا سطح بالایی از آنومالی‌های کروماتین دارند، پس از شستشوی نمونه، احتمالاً هنوز دارای اسپرم‌هایی با کروماتین غیرطبیعی هستند، که احتمال ورود این اسپرمهای غیرطبیعی در طی ICSI به داخل اووسیت وجود دارد(۲،۵).

در روش IVF برخلاف روش ICSI هیچ ارتباطی بین درصد پیش‌هسته‌های غیرمساوی با کمبود پروتامین مشاهده نشد و این ممکن است ناشی از این حقیقت باشد که زوناپلاسیدا مانند یک سد در مقابل اسپرمهای با کمبود پروتامین یا هیستون اضافی عمل می‌کند؛ بنابراین این اسپرم‌ها توانایی نفوذکردن به داخل اووسیت را ندارند. چون تحقیقات قبلی نشان داده است که تست CMA3 نسبت به آنیلین‌بلو برای تشخیص کمبود پروتامین تست حساس‌تری می‌باشد(۵) به همین دلیل بین این تست و درصد زیگوت‌های با پیش‌هسته‌های نامساوی رابطه معنی‌دار با ضریب همبستگی بیشتری بدست آمده است. همچنین یک رابطه منفی بین توانایی خروج از تراکم به روش SDS+EDTA با درصد زیگوت‌های محتوی پیش‌هسته نامساوی در نمونه‌های ICSI مشاهده شد. این موضوع می‌تواند ناشی از این حقیقت باشد که کروماتین چنین اسپرمهایی وقتی وارد اووسیت می‌شوند تمایل بیشتری برای خروج از تراکم دارند و بنابراین MPF دسترسی بیشتری به کروماتین دارد و سریعتر روی کروماتین اسپرم عمل می‌کند که منجر به‌PPCC می‌گردد، یک تفسیر دیگر این است که اسپرمهایی که سطح هیستون آنها بالاتر است، نسبت به اسپرمهایی که سطح هیستون پایین‌تری دارند، ممکن است برای خروج از تراکم توانایی بیشتری داشته باشند(۲۵).

سعی می‌شود در طی ICSI اسپرمهای با مرفولوژی طبیعی انتخاب و به تخمکها تزریق شوند که این امر موجب کاهش درصد زیگوتهای با پیش‌هسته‌های نامساوی می‌شود. در صورتیکه برای ICSI اسپرمها بصورت تصادفی انتخاب شود احتمالاً درصد زیگوت‌ها با پیش‌هسته نامساوی افزایش می‌یابد.

Downloaded from http://www.jri.ir

مطالعات دیگر دانشمندان نشان می‌دهد که در نمونه‌هایی که درصد CMA3 مثبت آنها بیش از ۳۰٪ می‌باشد میزان لقاح پایین‌تر است(۳). بنابراین در این مطالعه بیماران نسبت به سطح CMA3 مثبت گروه‌بندی شدند و نتایج جدول ۲ نشان داد که درصد زیگوتها با پیش‌هسته‌های نامساوی، میزان لقاح، ضریب کیفیت و میزان تقسیمات جنین در بیمارانی که CMA3 مثبت آنها بیش از ۳۰٪ است در مقایسه گروه دارای CMA3 مثبت کمتر از ۳۰٪ متفاوت می‌باشد.

در نتیجه، این مطالعه بیانگر آن است که بررسی وضعیت کروماتین در نمونه‌های منی از اهمیت خاصی برخوردار است. از آنجایی که کمبود پروتامین نه تنها مستقیماً روی میزان لقاح درIVF مؤثر است بلکه روی مرفولوژی پیش‌هسته‌ها بعد از ICSI و در نتیجه روی رشد اولیه رویان و احتمالاً روی لانه‌گزینی نیز مؤثر است(۲۶،۶). بنابراین برای ICSI باید از تکنیک‌هایی استفاده شود که اسپرمهای با کروماتین طبیعی را از نمونه جدا کند(۲۴،۲۳).

بعلاوه بهتر است روشها یا مداخلاتی همچون واریکوسلکتومی[1] که ممکن است روی کیفیت اسپرم تأثیر گذارد و باعث بهبود وضعیت کروماتین اسپرم شود قبل از انجام ICSI انجام گردد(۲۷).

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب شماره۸۰۰۷۹-۸۰۰۷۸/۸۰/P پژوهشکده رویان می‌باشد. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین مؤسسه رویان، متخصصین و کارشناسان مرکز باروری و ناباروری اصفهان و همچنین مدیریت گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ابراز می‌دارند.

References

1-Palermo G., Joris H., Devrory P., Van Steirteghem A.C. Pregnancy after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. Lancet. 1992; 340:17-18.

2-Van Steirteghem A.C., Liu J., Joris H., Nagy Z., Janssenwillen C., Tournay H., Deroey P.C. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection by sub zonal insemination: Report of a second series of 300 consecutive treatment. Hum Reprod. 1993;8: 1055-60.

3-Iranpour F.G., Nasr-Esfahani M.H., Valojerdi M.R., al-Taraihi T.M. Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. J Assist Reprod Genet. 2000;17(1):60-6.

4-Sakkas D., Urner F., Bianchi P.G., BizzaroD., Wagnar I., Jaquenoud N., Manicardi G., Campana I. Sperm chromatin anomalies can influence decongestion after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1996;11:837-43.

5-Nasr-Esfahani M.H., Razavi S., Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet. 2001;18 (4):199-205.

6-Esterhuizen A.D., Franken D.R., Lourens J.G.H., Van Zyl C., Muller I.I., Van Rooyen L.H. Chromatin packaging as an indicator of human sperm dysfunction. J Assist Reprod Genet. 2000;17(9): 508-14.

7-Ludwig M., Schopper B., Katalinic A., Sturm R., Al-Hasani S., Diedrich K. Experience with the elective transfer of two embryos under the conditions of the German embryo protection law: results of retrospective data analysis of 2573 transfer cycles. Hum Reprod. 2000;15(2):319-24.

8-Scott L., Alvero R., Lenodires M., Miller B. The morphology of human pronuclear embryo is positively related to blastocyst development and implantation. Hum Reprod. 2000; 15(11): 2394-403.

1-Varicoselectomy

Downloaded from http://www.jri.ir

relevance of the ability of the oocytes to form male pronucleus. Biol Reprod. 1993;49: 89-94.
19-Flaherty S.P., Payne D., Matthews C.D. Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1998;13(Suppl 1): 155-64.
20-Fulka J., Horska M., Moor R.M., Fulka J. and Kanaka J. Oocyte-Specific modulation of female pronuclear development in mice. Dev Biol. 1996;178:1-12.
21-Bedford J.M., Bent M.J., Calvin H. Variation in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphology normal human spermatozoa. J Repod Fertil. 1973;33:19-29.
22-Perrault S.D. Chromatin remodeling in mammalian zygotes. Mutat Res. 1992;296:43-55.
23-Sakkas D., Manicardi G.C., Tomlinson M., Mandrioli M., Bizzaro D., Bianchi P.G., Bianchi U. The use of two density gradient centrifugation techniques and swim up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. Hum Reprod. 2000; 15: 1112- 1116.
24-Hammadeh M.E., Kuhnen A., Amer A.S., Rosenbaum P., Schmidth W. Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. Int J Androl. 2001;24(6):360-8.
25-Foresta C., Zorzi M., Rossato M., Varotto I. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: Abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. Int J Androl. 1992;15:330-7.
26-Sakkas D., Urner F., Bizzaro D., Manicardi G., Bianchi U., Shoukir Y., Campana A. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure :Effect on fertilization and embryo development. Hum Reprod. 1998;13:11-19.
27-Nasr-Esfahani M.H., Behdadi Pour Z., Abbasi H., Zaman Soltani F., Mardani M., Abuhamzeh B. The effect of varicocelectomy on sperm parameters, membrane integrity and chromatin condensation. Yakhteh (cell) 2000;5:7-11.

9-Wittemer C., Bettahar-Lebugle K., Ohl J., Rongieres C., Nisand I., Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. Hum Reprod. 2000;15(12):2591-7.
10-Garello C., Barker H., Rai J., Montgomery S., Wilson P., Kennedy C.R., Hartshorne G.M. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? Hum Reprod. 1999;14(10):2588-95.
11-Goud P., Goud A., Van Oostveldt P., Van der Elst J., Dhont M. Fertilization abnormalities and pronucleus size asynchrony after intracytoplasmic sperm injection are related to oocyte post maturity. Fertil Steril. 1999;72(2):245-52.
12-Ma S., Yuen H. Intracytoplasmic sperm injection could minimize the incidence of prematurely condensed human sperm chromosomes. Fertil Steril. 2001;75(6):1095-101.
13-Fishel S., Aslam I., Tesarik J. Spermatid conception: A stage too early, or a time too soon? Hum Reprod. 1996;11(3):1371-5.
14-Terquem A., Dadoune J.P. Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin: Evaluation of nuclear maturation.1983; In Andr J (editor), The sperm cell, J andr (ed), London, Martinus Nijhoff publishers, pp 696-701.
15-Gonzales G.F., Salirrosas A., Dicina-Torres L.N., Sanchez A., Villena A. Use of clomiphene citrate in the treatment of men with high sperm chromatin stability. Fertil Steril. 1998;69:1109-114.
16-Kruger T.F., Acosta A.A., Simmons K.F., Swanson R.J., Matta J.F., Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. Fertil Steril. 1988;49:112-7.
17-Perrault S.D., Barbee R.R., Slott V.L. Importance of glutathione in the activity and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. Dev Biol. 1988;125:181-6.
18-Yoshida M., Ishigaki K., Nagai T., Chikyu M., Purset V.G. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes:

Downloaded from http://www.jri.ir